



JM 109

COMPETENT high

Competent Cell Kit Code No. DNA-900

取扱説明書

〔製造・販売元〕

東洋紡績株式会社

ー納期・注文に関するお問い合わせー

バイオ事業部(大阪)

〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号

TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833

バイオ事業部(東京)

〒103-8530 東京都中央区日本橋小網町17番9号

TEL 03-3660-4619 FAX 03-3660-4951

ー製品の内容・技術に関するお問い合わせー

テクニカルライン

TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833

開設時間: 9:00~12:00 13:00~17:00 (土、日、祝を除く)

e-mail: techosk@bio.toyobo.co.jp

〔URL〕<http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr>

(1) キットの内容

Competent Cell	100 μ l \times 10本
pBR 322 DNA (1 pg/ μ l)	50 μ l \times 1本
SOC medium	1 ml \times 10本

(2) 品質

形質転換効率	1 pgのpBR 322 で形質転換した場合 5 \times 10 ⁸ transformants/ μ g \cdot pBR 322 (液体窒素保存) * -80 $^{\circ}$ C 保存では 10 ⁷ オーダーになります。
F 保持率	> 99%

(3) 保存方法

-80 $^{\circ}$ C, 液体窒素

(4) Genotype

recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96
relA1 thi Δ (lac-proAB)
F' [traD36 proAB⁺ lacI⁺ lacZ Δ M15]

(5) 形質転換方法

- ① Competent Cell を融解して、Falcon チューブ (2059) に 100 μ l 移す。
- ② 形質転換する DNA を加える。
- ③ 水中に 30 分間放置する。
- ④ 42 $^{\circ}$ C のヒートショックを 30 秒間行う。
- ⑤ 水中で 2 分間冷却する。
- ⑥ SOC medium を 900 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間振とう培養する。
- ⑦ LB/Amp プレートに適量まく。
- ⑧ 37 $^{\circ}$ C で一晩培養する。

SOC medium	2%	Bacto tryptone
	0.5%	Bacto yeast extract
	10mM	NaCl
	2.5mM	KCl

上記組成の培地をオートクレーブ滅菌後、フィルターろ過した Mg²⁺ ストック溶液と、別殺菌したグルコースストック溶液を、下の濃度になるよう加えている。

20mM	MgSO ₄ , MgCl ₂ (10mM each).
20mM	Glucose

(6) 参考文献

Hanahan, D. J. Mol. Biol., 166, 557. (1983)

(7) 形質転換に関する特記事項

(以下の検討は、DH5, JM109, HB101 等種々のコンピテントセルで行った。)

① DNA 及びコンピテントセル量について

- (1) 加える DNA の液量がコンピテントセル容量の 25% に達すると効率は半減する。(Fig. 1)
- (2) DNA を 10ng 以上用いると、1 μ g DNA あたりの Transformant 数は減少する。(Fig. 2)
- (3) プラスミドサイズが 7.5Kb 以上になると効率がかなり低下する。(Fig. 3)
(使用 plasmid の分子数が同数となるようにして形質転換を行った。)
- (4) コンピテントセル使用量が 50~200 μ l の範囲では効率は変わらないが、10 μ l で半減、400 μ l で倍増する。(Fig. 4)

② ヒートショックについて

- (1) DNA をコンピテントセルに添加してからヒートショックを行うまでの時間が 15~60 分間のとき形質転換効率に影響しない。
- (2) 42 $^{\circ}$ C ヒートの場合、ヒート時間は 15~60 秒が適している。また 30 秒ヒートの場合、35~52 $^{\circ}$ C の間でヒートすればよい。(Fig. 5)

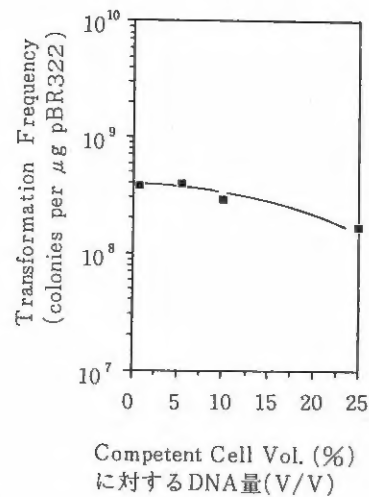
③ ヒートショック後の培養について

- (1) LB 培地に比べ SOC 培地を用いたときは、効率が 5 倍上がる。(Fig. 6)
- (2) 培養時間や培養時の振とう数は効率に影響しない。

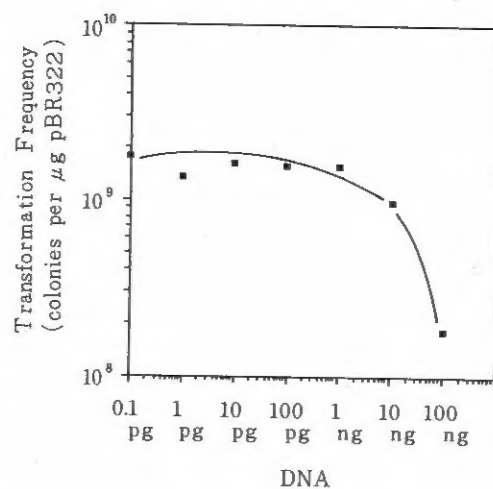
④ 形質転換効率の安定性について

- (1) 一度融解したコンピテントセルを再凍結すると、効率は 1/4~1/10 に低下する。(Table 1)

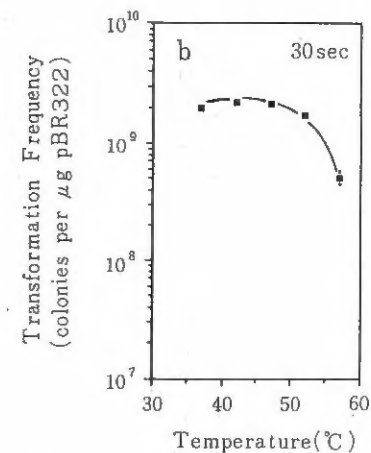
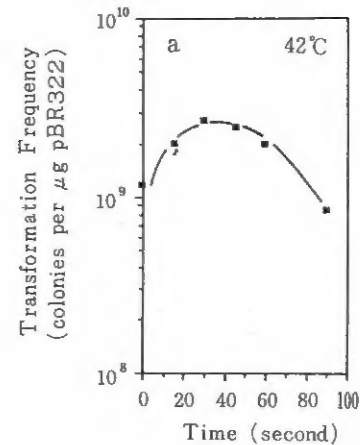
(Fig.1)



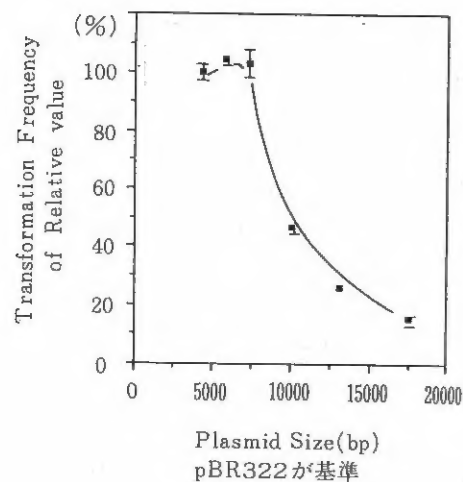
(Fig.2)



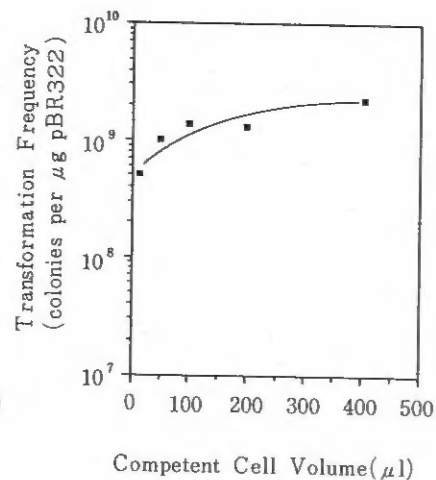
(Fig.5)



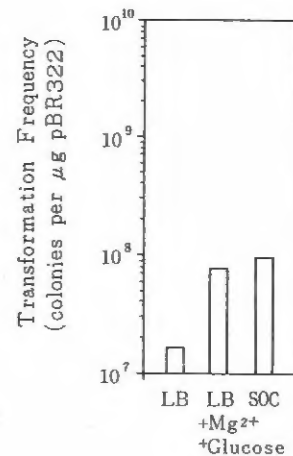
(Fig.3)



(Fig.4)



(Fig.6)



(Table 1)

保存	凍結	液体 N_2	-80°C
液体 N_2		27%	—
-80°C		10%	8.3%

再凍結前のコンピテントセルの形質転換効率を 100%とし、上記条件で 1 カ月保存後の形質転換効率を調べた。
(— は未実施)